

大腸菌の挿入因子 IS3 の転移とその調節機構に関する研究

Molecular mechanism of transposition and its regulation of *E. coli* insertion element IS3

研究代表者 東京大学分子細胞生物学研究所 助手

関根 靖彦

Instructor, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo
Yasuhiko SEKINE

IS3 is an insertion sequence in *E. coli*. IS3 encodes two out-of-frame, overlapping open reading frames, *orfA* and *orfB*, and produces OrfAB transframe protein, that is IS3 transposase, via -1 translational frameshifting between *orfA* and *orfB*. An IS3 mutant which overproduces transposase generates two types of characteristic small molecules, IS3 circles and linear IS3 molecules. Here I showed that IS3 circles transposed to target molecules in transposase-dependent manner and that IS3 circles were converted to a linear form by a staggered, double-strand break introduced by transposase. These results suggest that IS3 transposes through formation of an IS3 circle, conversion to a linear form, and insertion into a target molecule. Introduction of a mutation into the terminal sequences of IS3 circles reduced the efficiency of the conversion to a linear form and completely abolished the transposition ability of the IS3 circles. This indicates that the terminal sequences of IS3 play an important role in transposition of IS3 circles. I also showed here that the OrfA protein reduced the frequency of transposition of IS3 and that both OrfA and OrfB inhibited IS3 transposition almost completely. These results suggest that OrfA acts as a transposition inhibitor and that OrfB stimulates the inhibitory action of OrfA. To analyze IS3 transposition reaction biochemically, I purified transposase and OrfA as His-tagged proteins and examined their DNA-binding properties.

1. 研究目的

転移性遺伝因子 (トランスポゾン) は生物のゲノムに普遍的に存在し、それが引き起こす様々なDNA 組換え現象を通してゲノムの変異や再編成に関与していると考えられている。挿入因子(Insertion Sequence; IS)は構造が最も簡単な転移性遺伝因子であり、殆ど全てのバクテリアのゲノム上に存在する。ISはその配列の類似性からいくつかのファミリーに分類されているが、IS3は最大規模のファミリーである IS3ファミリーの代表的メンバーである。これまでに、本研究代表者による研究により、IS3内の互いに out-of-frame の二つのオープンリーディングフレーム *orfA* と *orfB* から -1 方向の翻訳レベルのフレームシフトを介して生じる両 *orf* の融合タンパク質が転移に必要な酵素トランスポゼースであること (Fig. 1 参照)、トランスポゼースを過剰に産生すると、IS3 を運ぶプラスミドから転移反応の中間体と考えられる環状、直鎖状 IS3 分子が生じること (Fig. 3 参照) が明らかになっている。環状分子を中間体として転移する IS は現在のところ知られておらず、環状、直鎖状分子は転移反応の新しい経路を反映するものと考えられた。

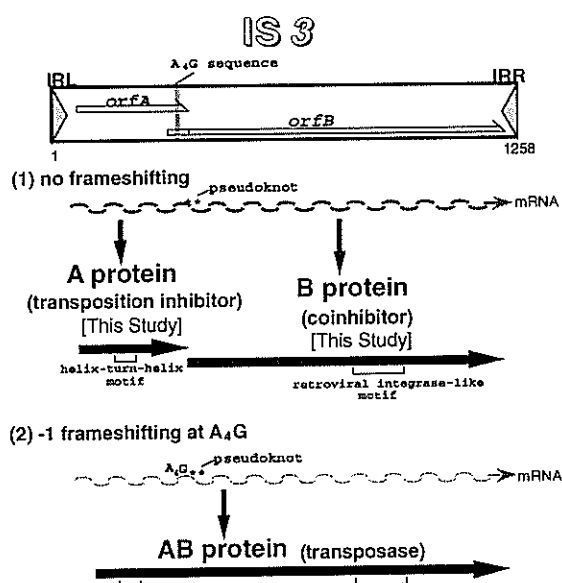


Fig. 1. Structure and gene expression of IS3

本研究はこれらの特異分子の解析を通して、IS3の転移反応がいかに開始され終結されるのか、またいかに調節されるのかについてを *in vivo*、*in vitro* の各側面から分子レベルで解明することを目的として行った。

2. 研究経過

2.1. トランスポゼースの作用により生じる環状、直鎖状分子の解析

前述したように、IS3を運ぶプラスミドを保持する大腸菌内でトランスポゼースを誘導産生させると、IS3がその両端の逆向き反復配列 (inverted repeat; IR) で3塩基対配列を挟む形に環状化した分子、及び両端に突出した3塩基を有する形の直鎖状のIS3分子が生じる。これらの分子の3塩基 (対) の配列は、IS3を運ぶプラスミドにおいてIS3に隣接していた配列に由来する。これら特異な構造をもつ2種の分子の転移における役割及び各分子の生成機構を知るために、以下の実験を行った。

2.1.1. 環状IS3の直鎖状化

環状IS3分子の両IRとそれらがはさむ3塩基対の介在配列部分をクローニングしたプラスミド (以下、環状IS3モデル分子と呼ぶ) を保持する大腸菌内で、トランスポゼースを誘導産生させたところ、このプラスミドは1ヶ所で切断された。切断部位をプライマー伸長法で調べたところ、環状IS3モデル分子は、IRと介在配列の間で3塩基を突出させるような二重鎖切断により、直鎖状IS3分子と相似の直鎖状分子に変換されることがわかった。

2.1.2. 環状IS3の転移

環状IS3モデル分子と転移の標的プラスミドを大腸菌内に共存させ、トランスポゼースを別のプラスミドから供給した。この大腸菌の培養液からDNAを抽出した後、エレクトロポレーションを利用して受容菌に導入した。各分子の薬剤耐性マーカーを利用して、標的に環状モデル分子が転移して生じた分子を選択、計測した。その結果、環状IS3モデル分子はトランスポゼースに依存して、IRを両末端にする形で標的に挿入したことがわかった。生じた転移産物において、ISの両端にはトランスポゾンの転移反応に特徴的な標的配列の重複が起きていた。以上の結果は、環状IS3分子が転移の終産物ではなく、転移中間体であることを強く示唆している。

2.1.3. 直鎖状IS3が持つ突出3塩基の配列の決定

内部のトランスポゼース遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^r)に置き換えたmini-IS3を、ISに隣接する3塩基対の配列が両側で異なるようにしてプラスミドにクローニングした (pSEK503 in Fig. 2)。別のプラスミドから供給されるトランスポゼースの作用でpSEK503から生じた直鎖状IS3分子を単離した。この分子の末端を平滑化した後でプラスミドにクローニングし、突出3塩基の配列を決定した。その結果、同じ直鎖状分子の両端の突出3塩基はすべて互いに相補的な配列であった (Fig. 2A)。

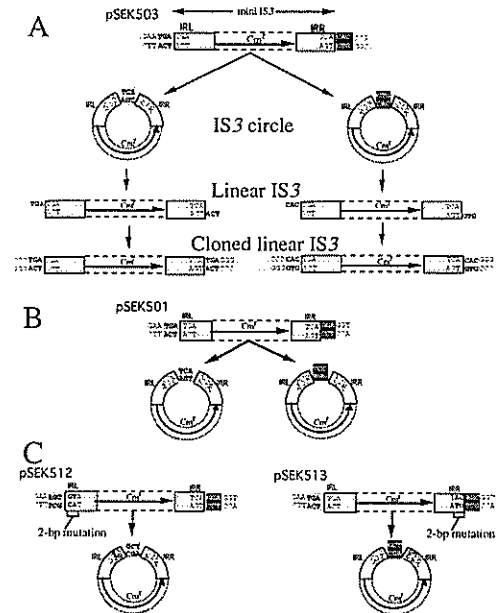


Fig. 2. Structures of the circular and linear mini-IS3 molecules generated from plasmids carrying mini-IS3. (A) Structures of the circular and linear mini-IS3 molecules generated from pSEK503. Two different 3-bp sequences that flank mini-IS3 which consists of IRL and IRR the Cm^r gene are shown by different shadowings. The mini-IS3 circles are thought to be linearized by a double-strand break at the intervening sequence. The linear IS3 molecules, cloned into pUC118 after their treatment with DNA polymerase to fill the protruding ends, are shown. (B) Structures of the mini-IS3 circles generated from pSEK501. (C) Structures of the mini-IS3 circles generated from pSEK512 or pSEK513. pSEK512 and pSEK513 have a 2-bp mutation in the terminal dinucleotide with respective mutations in IRL and IRR.

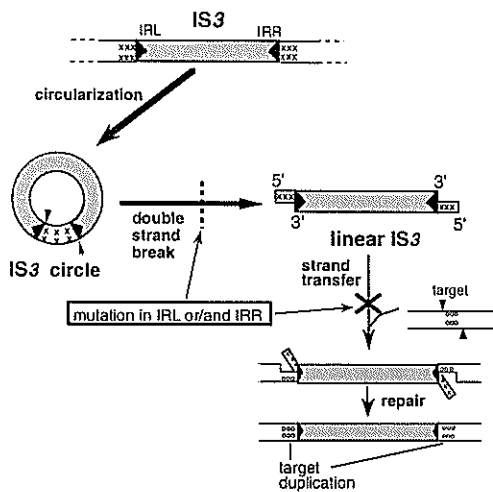


Fig. 3. Proposed pathway for IS3 transposition

この結果は、直鎖状 IS3 分子は、親プラスミドから直接切り出されるのではなく、一旦、環状分子が生じ、この環状分子上の両 IR の末端で再び DNA 切断が起こり直鎖化するによって生じることを示している。

2.1.1.~2.1.3.の結果より、IS3は、IS3を運ぶ親プラスミド→環状 IS3 分子→直鎖状 IS3 分子→標的分子への挿入、という経路により転移すること (Fig. 3) が示唆された。

2.2. IS3 末端の保存塩基配列の機能解析

IS3 family の IS の IR 末端配列はみな 5' TG--CA 3' である。この末端配列に変異を導入し、その効果を調べた。

2.2.1. 末端を変異させた IS3 から生じる環状分子の構造

野生型 IR を持つ mini-IS3 から生じる環状 IS3 分子は、元の分子 (pSEK501) において IS の両端に隣接していたどちらか一方の 3 塩基配列を介在配列として持つ (Fig. 2B)。片端の保存配列を変異させた mini-IS3 からは、野生型の mini-IS3 とほぼ同効率で環状分子が生成したが、生じた環状分子の介在配列はすべて、変異させた末端に隣接していた配列であった (Fig. 2C)。この分子の構造は野生型の IR 末端が変異型 IR の外側 3 塩基目につながってできたと説明でき、このことは、環状分子の生成は、一方の IR の 3'-末端にある水酸基 (3'-OH) が他方の IR 近傍を攻撃するという機構で起こり、この攻撃に IR 末端の保存配列が重要であることを示す。

2.2.2. IR 末端を変異させた環状 IS3 分子から生じる直鎖状分子とその転移

環状 IS3 分子の IR 末端の保存配列を片端において変異させた分子は、トランスポゼースの作用による直鎖化は起こるがその効率は野生型より低く、また、標的分子への転移能はほとんど失っていた。これらの結果は、環状分子の直鎖化及び転移には両 IR の末端配列が重要であり、特に転移には必須であることを示す (Fig. 3)。

2.3. OrfA、OrfB タンパク質の機能解析

フレームシフトがおこらない場合には 2 種のタンパク質、OrfA、OrfB、が産生される。各タンパク質を誘導産生できるプラスミドを構築し、2.1.2.に述べた転移頻度測定系に導入して、OrfA、OrfB タンパク質の転移反応に与える効果を調べた。その結果、OrfA は IS3 の転移を強く阻害し、OrfB は OrfA による阻害作用をさらに増強することがわかった。一方、OrfB 単独では阻害作用を示さなかった。また、OrfA タンパク質は 2.1.1.に述べたトランスポゼースによる環状 IS3 分子の直鎖状化反応も阻害することを示す予備的な結果も得られた。

トランスポゼオンは、宿主ゲノムにある程度安定に存在し続けるために、自らの転移を低レベルに抑える機構を内蔵していると考えられる。この研究により、OrfA、OrfB タンパク質がこの機構の主要な factor であることが明らかになった (Fig. 1 参照)。

2.4. IS3 がコードする各種タンパク質の精製と、それらの性質の解析

IS3 の転移反応におけるトランスポゼースや OrfA、OrfB タンパク質の分子レベルでの作用機構を生化学的に解析する目的で次の実験を行った。

2.4.1. トランスポゼース及び OrfA、OrfB タンパク質の精製

IS3 がコードする 3 種のタンパク質それぞれをポリヒスチジンのタグ (His-tag) との融合タンパク質の形で産生できるプラスミドを構築した。このプラスミドを用いて、各タンパク質を大腸菌内での過剰産生を試みた。その結果、OrfA は大量に、トランスポゼースは少量ながら産生が確認できたので、これらのタンパク質を His-tag にアフィニティーをもつ Ni-NTA カラムによるクロマトグラフィーで精製した。残念ながら、OrfB は大腸菌内での産生は今のところ確認できていない。

2. 4. 2. トランスポゼース、OrfAタンパク質のDNA結合活性

2. 4. 1. で得られたタンパク質標品を用い、ゲルシフトアッセイによってトランスポゼース、OrfAタンパク質のDNAに対する結合活性を解析した。その結果、両タンパク質ともにDNAに対する配列非特異的結合活性を持つこと、この結合活性は酸性条件下で強くなることが分かった。さらにOrfAタンパク質はpH7付近においてIR配列特異的な結合活性も持つことが明らかとなった。orfAにコードされる領域にはDNA結合モチーフとして知られる α helix-turn- α helix構造を形成すると予想されるアミノ酸配列があることから、OrfAタンパク質はIR特異的な結合活性を有していると考えられる。またIS3はさまざまな部位に転移することを考えると、トランスポゼースが持つ配列非特異的結合活性は転移標的の捕捉に関与していると予想される。

3. 研究成果

トランスポゼースの作用により生じる環状、直鎖状分子が転移中間体であることを示すとともに、IS3は、IS3を運ぶ親プラスミド→環状IS3分子→直鎖状IS3分子→標的分子への挿入、という経路により転移する新しいタイプのトランスポゾンであること (Fig. 3参照) が示唆された。また、これらの反応の各ステップにおける、ISの末端配列やOrfA、OrfBタンパク質の役割が明らかになった事により、転移反応やその調節の分子機構に関する知見が得られた。トランスポゼース、OrfAタンパク質の精製に成功し、これらを用いた転移反応の生化学的解析への途が開かれた。

本研究により明らかになったIS3の転移機構は、レトロウイルスを初めとするレトロ因子の宿主染色体への組み込み反応と類似しており、本研究成果は、IS一般にとどまらず、真核生物のトランスポゾンであるレトロ因子の組み込み反応機構の研究にも示唆的な知見を与えるものであると考えられる。

4. 今後の課題と発展

本研究において精製されたトランスポゼースやOrfAタンパク質を用いて、本研究によって明らかになった*in vivo*におけるIS3の転移反応及びその調節反応を*in vitro*系で再現することを目指したい。*in vitro*反応系が確立すれば、各素反応を詳細に解析することができるようになるはずである。具体的には、トランスポゼースによって、IS末端でのDNA切断活性や切断により

生じたDNA末端と他のDNA分子との連結反応がおこるか、また、これらの反応におけるOrfAタンパク質の (また、OrfBも精製できればOrfBも) 添加の効果などについての解析を進めたい。

トランスポゾンの転移反応はその他のDNA組換え反応と類似している点が多くあることから、IS3の転移機構の研究は、原核、真核生物共通のDNA組換え反応のモデル系としてますます重要な意義を持つようになることが予想される。

5. 発表論文リスト

1. Inhibition of transpositional recombination by OrfA and OrfB proteins encoded by insertion sequence IS3. Sekine, Y., Izumi, K., Mizuno, T. and Ohtsubo, E. *Genes Cells*, 1997, 2, 547-557
2. Linearization and transposition of circular molecules of insertion sequence IS3. Sekine, Y., Aihara, K. and Ohtsubo, E. *J. Mol. Biol.* (accepted)
3. Characterization of DNA binding activity of IS3-encoded proteins. Sekine, Y., Minematsu, H. and Ohtsubo, E. (投稿準備中)